

# Molekulárně-biologická diagnostika v onkologii

**Maligní nádorová onemocnění** charakterizuje autonomní invazivní růst nádorových buněk a jejich schopnost vytvářet vzdálené metastázy. Transformace buňky normální v buňku nádorovou závisí obvykle na přítomnosti většího počtu mutací genů různých tříd. Kancerogenně působí ionizující záření, chemické látky či biologická agens (onkogenní viry). Rovněž **dědičné mutace** specifických genů (např. tumorsupresorových genů) mohou být příčinou vývoje zhoubného nádorového onemocnění.

## Sporadický a familiární výskyt nádorových onemocnění

**Sporadický výskyt**, který není vázán na genetickou predispozici, ale na působení zevních faktorů, u většiny nádorů výrazně převládá. Mezi hereditární nádorové syndromy, na jejichž vývoji se podílí zejména dědičné mutace nádorových supresorových genů, patří například:

- familiární adenomatózní polypóza (FAP) s hereditárními mutacemi genu **APC**;
- Lynchův syndrom (*hereditary nonpolyposis colorectal cancer* – **HNPCC**; hereditární nepolypózní kolorektální karcinom) se zárodečnými mutacemi genů **MSH2**, **MLH1**, **MSH6**, **PMS1** (*mismatch repair genes*);
- syndrom hereditárního karcinomu prsu a ovaria s mutacemi genů **BRCA1** a **BRCA2**;
- hereditární retinoblastom s mutacemi genu **RB**;
- Li-Fraumeniho syndrom s mutacemi genu **p53**.<sup>[1]</sup>

**Hereditární nádory** často vznikají v nižším věku než nádory sporadické, často jsou bilaterální a typické jsou rovněž nádorové duplicity. Za vývoj hereditárního nádorového onemocnění může odpovídat vyšší počet genů. Například predispozice k nepolypóznímu kolorektálnímu karcinomu se vyskytuje u dědičných mutací řady genů zasahujících do DNA reparačních pochodů.

 *Podrobnější informace naleznete na stránce hereditární nádorové syndromy.*

**Specifita vůči určité tkáni** se u mutací jednotlivých tumor supresorových genů výrazně liší. Zárodečné mutace genu **RB** jsou například spojeny zejména s rizikem (> 90 %) vývoje retinoblastomu (často oboustranného v časném dětském věku); naproti tomu v rodinách s hereditárními mutacemi genu **p53** se vyskytují různé nádory: nádory prsu představují 28,1 % všech malignit, nádory mozku 15,1 %, sarkomy měkkých tkání 12,8 %, osteosarkomy 12,3 %, nádory nadledvin 7,1 %, hematologické malignity 3,2 %, ostatní nádory 21,4 %<sup>[2]</sup>.

U pacientů s familiárním výskytem nádorového onemocnění potvrzuje genetické vyšetření jeho hereditární původ. Asymptomatickým rodinným příslušníkům pak poskytuje informaci o nádorové predispozici (o riziku vývoje nádorového onemocnění). U osob s vysokým rizikem nádorového onemocnění (u nosičů mutací) lze navrhnout **preventivní screeningový program** zaměřený na jeho časnou diagnostiku.

## Molekulárně-biologická diagnostika

### Analyzovaný materiál

Analyzovaným genetickým materiálem je obvykle genomová DNA; někdy se testuje i RNA. Genetický materiál se nejčastěji získává z leukocytů periferní nesrážlivé krve nebo z nádorové tkáně (získané bezprostředně po chirurgickém výkonu nebo archivované v parafinových bločcích). K průkazu mikrosatelitové nestability (MSI – *microsatellite instability*) nebo ztráty heterozygosity (LOH – *loss of heterozygosity*) v nádorových buňkách se analyzuje DNA získaná jak z nádorové, tak normální tkáně.

### Typy mutací

 *Podrobnější informace naleznete na stránce Mutace.*

Mutace lze definovat jako stabilní změny v nukleotidové sekvenci nebo uspořádání DNA. Při poškození zárodečných buněk se přenáší na potomstvo a mohou být příčinou hereditárních nádorů. Somatické mutace jsou pak významné v genezi sporadických nádorů. Podle typu lze mutace dělit na **substituce**, které představují tranzice (A ↔ G nebo C ↔ T) nebo transverze (C/T ↔ A/G), **delece**, **inzerce**, **duplikace** a **rozsáhlé genomové delece a přestavby**. Rozsáhlé delece nebo chromozomové translokace mohou vést k mikroskopicky prokazatelným strukturálním změnám chromozomů. Mutace lze rovněž dělit podle účinku:

- **Synonymní mutace** nemění smysl kodonu a nezpůsobuje záměnu aminokyselin.
- **Missense mutace** naopak mění smysl kodonu v důsledku čehož dochází k inkorporaci odlišné aminokyseliny.
- **Nonsense mutace** vede ke vzniku stop kodonu, a proto ukončuje translaci.
- **Posunové mutace** vedou k posunu čtecího rámce a obvykle i k předčasnému ukončení syntézy proteinu.

### Analýza mutací

Při analýze mutací se vhodné genové fragmenty většinou nejdříve amplifikují pomocí PCR (případně RT-PCR) a jejich sekvenční analýza pak slouží k určení mutace. Při použití prescreeningových testů v mutační analýze slouží následné sekvenování k potvrzení a charakterizaci mutace. K prescreeningu mutací genů odpovědných v tumorigenezi lze použít řadu metod. **Analýza polymorfismu délky restrikčních fragmentů** (RFLP-analýza) lze použít k detekci známých bodových mutací (zasahujících do rozpoznávacích sekvencí restrikčních enzymů), které se typicky vyskytují např. u ras onkogenů. Elektroforetické metody, např. DGGE (*denaturing gradient gel electrophoresis*) a SSCP (*single strand conformation polymorphism*), patří ke standardním technikám, které detekují změny v nukleotidové sekvenci amplifikovaného fragmentu DNA. Kromě patogenních mutací se těmito metodami detekují i nepatogenní polymorfismy nebo sekvenční varianty, jejichž význam může být sporný (některé missense mutace).

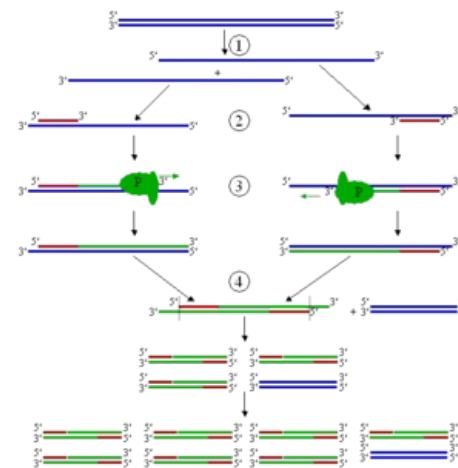


Schéma PCR

Pomocí **PTT** (*protein truncation test*) je možné zachytit patogenní mutace vedoucí k předčasnému ukončení translace (nonsense mutace, posunové mutace). Fragmenty amplifikované pomocí PCR (RT-PCR) nesoucí promotorovou fágovou sekvenci a sekvenci nutnou pro zahájení eukaryonní translace (*Kozak sequence*) slouží u této techniky jako templát pro syntézu RNA in vitro a následnou translaci (prováděnou v přítomnosti značené aminokyseliny). Syntetizované proteiny se dále separují pomocí polyakrylamidové elektroforézy v přítomnosti SDS (SDS PAGE) a detekují se autoradiograficky. Podle velikosti translačních produktů je možné přibližně lokalizovat mutaci. Metoda umožňuje analyzovat dlouhé genové fragmenty (1000–2000 bp) a používá se při analýzách genů, které jsou ve většině případů inaktivovány mutacemi vedoucími ke zkrácení proteinu (např. gen *APC*, geny *BRCA1/BRCA2*).

## MLPA a aCGH analýza

**Rozsáhlé genomové delece a přestavby**, které mohou v případě některých tumorsupresorových genů představovat více než 10 % patogenních mutací, se obvykle prokazují pomocí **MLPA** (*multiple ligation-dependent probe amplification*)<sup>[3]</sup>, eventuálně **aCGH** (*oligonucleotide array-based comparative genomic hybridization*) analýzy<sup>[4]</sup>. Po ohraničení delece (přibližném určení míst zlomů) se zkrácený genový fragment nesoucí deleci amplifikuje pomocí PCR a delece (genomová přestavba) se charakterizuje na základě sekvenční analýzy.

- U **MLPA-analýzy** se změny v počtu genových kopií detekují na základě rozdílů v hybridizaci gen specifických oligonukleotidových sond. Po ukončení hybridizace se sondy specifické vůči jednotlivým exonům spojí DNA ligázou a po následné amplifikaci se produkty PCR odlišné délky rozdělí v genetickém analyzátoru. Vzájemným porovnáním velikostí jednotlivých vrcholů lze provést kvantifikaci všech exonů příslušného genu a určit rozsah genové alterace.
- U **aCGH** se určuje počet genových kopií na základě rozdílu v hybridizaci analyzované a referenční DNA. Při použití aCGH specifické pro určitý chromosom s vysokou hustotou oligonukleotidových sond je možné poměrně přesně lokalizovat genovou alteraci (deleci nebo duplikaci).

## Ztráta heterozygosity

Průkaz ztráty heterozygosity intragenových nebo v blízkosti genu ležících mikrosatelitových markerů v nádorových buňkách vypovídá o deleci alely příslušného genu. Typicky se dá ztráta heterozygosity prokázat u hereditárních nádorových syndromů způsobených zárodečnými mutacemi tumorsupresorových genů. Analýza se používá k **průkazu inaktivace obou alel** tumorsupresorového genu v nádorové tkáni. **Nestabilita mikrosatelitů** se typicky prokazuje v nádorových buňkách u **Lynchova syndromu**. Rozdílná délka mikrosatelitových repetitivních sekvencí v nádorové tkáni při srovnání s tkání normální vzniká v důsledku defektu v DNA reparačních pochodech u hereditárních mutací mismatch repair genů.

## Minimální reziduální nemoc

Jako minimální reziduální nemoc (*minimal residual disease – MRD*) se označuje stav **kompletní klinické remise**, kdy u pacienta nelze běžnými metodami (např. cytogenetickými) prokázat minimální počet přítomných nádorových buněk. Použitím molekulárně-biologických metod se podařilo výrazně **zvýšit citlivost detekce nádorových buněk**. Pomocí **PCR** nebo **RT-PCR** je možné detekovat jedinou nádorovou buňku ve vzorku s vysokým počtem (až 10<sup>6</sup>) buněk normálních. Většinou se **vysoké citlivosti** detekce cílového fragmentu DNA (specifického pro nádorové buňky) dosahuje **dvoustupňovou amplifikací** (nested PCR).

Detekce MRD pomocí PCR analýz se využívá především u **hematologických malignit**, eventuálně aCGH analýzy<sup>[5]</sup>. Například u **CML** lze zachytit pomocí RT-PCR **transkript fúzního genu *bcr-abl***, který se vyskytuje v nádorových buňkách u více než 90 % onemocnění. Stav „kompletní molekulární remise“, kdy po terapii opakovaně nelze pomocí PCR nebo RT-PCR detekovat nádorové buňky, se považuje za příznivý prognostický faktor. V současnosti kvantitativní PCR metody umožňují sledovat v čase přírůstek či úbytek přežívajících nádorových buněk.

## Použitá literatura

- VOGELSTEIN, Bert a Kenneth W KINZLER. *The Genetic basis of human cancer*. 1. vydání. New York : McGraw-Hill, 0000. 731 s. ISBN 0-07-067596-1.

- TAVASSOLI, Fattaneh A a Peter DEVILLE. *Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs*. 1. vydání. Lyon : IARC Press, 2003. 432 s. World Health Organization classification of tumours; sv. 5. ISBN 92-832-2412-4.